

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

На правах рукописи



Иванова Вилена Витальевна

**Роль кардиолипина в функционировании мембранных
белковых комплексов *Escherichia coli***

03.01.04. – Биохимия
03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре биохимии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и в лаборатории молекулярной биологии Центра наук о здоровье, г.Хьюстон, шт. Техас, США.

Научные руководители:

кандидат биологических наук, доцент
Невзорова Татьяна Александровна

кандидат биологических наук, доцент
Богданов Михаил Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук
Фаизов Тагир Хадиевич
(профессор, заведующий лабораторией биохимии и молекулярно- генетического анализа ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань).

доктор биологических наук,
Шарипова Маргарита Рашидовна
(профессор кафедры микробиологии ИФМиБ КФУ, г. Казань).

Ведущая организация:

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики казанского научного центра российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН)

Защита диссертации состоится «12» декабря 2013 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, аудитория 211.

Факс 8(843)238-76-01, E-mail: jassyra@mail.ru,

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан

«11» ноября 2013 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук

З.И. Абрамова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Кардиолипид (КЛ), или дифосфатидилглицерин – фосфолипид с четырьмя остатками жирных кислот, который в эукариотических клетках входит в состав мембран митохондрий и является одним из главных фосфолипидов мембран прокариот.

КЛ - важный структурный компонент бактериальной мембраны *E.coli* (Krebs et al., 1979). В мембранах дикого типа *E.coli* содержится от 5 до 15% КЛ от всех фосфолипидов (Tan et al., 2012). Уровень КЛ может увеличиваться при стрессе, например, при увеличении концентрации солей в среде (Евдокимова и др., 1977). Вероятно, это связано с необходимостью улучшения энергетического обмена клетки и поддержанием структуры мембраны (Mileykovskaya et al., 2009; Schlame et al., 2009).

В настоящее время известно о наличии трех кардиолипинсинтаз *E.coli*: кардиолипинсинтаза А (ClsA), кардиолипинсинтаза В (ClsB) и кардиолипинсинтаза С (ClsC). Данные ферменты функционируют с разной активностью в зависимости от фазы роста, при этом механизм синтеза КЛ кардиолипинсинтазой С является уникальным и обнаружен только в клетках *E.coli* и заключается в конденсации молекулы фосфатидилглицерина и фосфатидилэтаноламина. Неизвестно, способен ли КЛ к движению по типу флип-флоп, поэтому наличие нескольких генов кардиолипинсинтаз может быть связано с необходимостью регулировать его содержание на внешней и внутренней сторонах мембраны независимо (Guo, 2000; Mileykovskaya et al., 2009; Bogdanov, 2011; Tan et al., 2012). Изучение топографии различных кардиолипинсинтаз в мембране *E.coli* будет способствовать определению функциональной роли КЛ в клетке.

В исследованиях *in vitro*, с использованием искусственных мембран и нанодисков, было показано, что изменения в фосфолипидном составе, например отсутствие фосфатидилглицерина или фосфотидилэтаноламина, могут повлечь за собой конформационные и топологические изменения мембранных белков, выполняющих определенные функции в клетке, такие как, например, транслокация и фолдинг мембранных белков комплексом SecYEG, электрон-транспортная функция комплексом II дыхательной цепи, что, в конечном итоге, может привести к нарушению протонного градиента и транспорта необходимых веществ внутрь клетки пермеазами и поринами и т.д. (Cecchini, 2003; White, 2003; Yankovskaya, 2003; Zimmer, 2008; Bekker et al., 2009). Подобные гипотезы нуждаются в подтверждении *in vivo*, чего ранее не проводилось.

Некоторыми авторами (Gidden, 2009; Quigley and Tropp, 2009; Geiger, 2010), было выдвинуто предположение о том, что наличие КЛ в бактериальной мембране, активно выполняющей метаболическую и энергетическую функцию, может быть необходимо для стабилизации белковых комплексов, осуществляющих перенос электронов и участвующих в процессах окислительного фосфорилирования, но экспериментально функция КЛ не установлена.

КЛ может быть также важен для выживания клетки *E.coli* в экстремальных условиях вследствие его возможного непосредственного участия в передаче протонов с одной стороны мембраны на другую, таким образом регулируя кислотность клетки (Arias-Cartin, 2011; Bayse and O’Gara, 2007; Gold, 2010).

Изучение роли КЛ в регуляции мембранного потенциала и энергетического баланса клетки *E.coli* имеет большое фундаментальное и практическое значение, так как может позволить создать модель данного процесса в кардиомиоцитах с целью снижения риска развития сердечной недостаточности.

Изучение взаимосвязи липидного микроокружения и стабильности мембранных белков, таких как порины OmpF и OmpA, которые являются экстрацеллюлярными антигенами и транспортерами низкомолекулярных антибиотиков и других соединений, имеет не только фундаментальное значение, но и может быть использовано в терапии бактериальных инфекций, например, для повышения эффективности антибиотиков.

Цель работы: характеристика участия кардиолипина в структурной организации и функционировании мембранных белковых комплексов *E.coli*: комплекса II дыхательной цепи, транслокона SecYEG, пермеазы лактозы LacY, щелочной фосфатазы PhoA и порина OmpF.

Основные задачи исследования:

1. Установить ориентацию активных центров кардиолипинсинтаз в плазматической мембране *E.coli*.
2. Исследовать роль кардиолипина в ассоциации субъединиц макромолекулярного комплекса II дыхательной цепи.
3. Изучить влияние кардиолипина на формирование функционально-активного макромолекулярного комплекса транслокона SecYEG.
4. Определить участие кардиолипина в фолдинге мембранных белков LacY, PhoA и OmpF.
5. Выявить участие кардиолипина в поддержании клеточного pH *E.coli*.

Научная новизна. Впервые определена топография кардиолипинсинтаз во внутренней мембране *E.coli*. Выявлено, что активный центр кардиолипинсинтазы А, обладающей максимальной активностью и являющейся основной, обращен внутрь клетки (в цитоплазму), в то время как у других кардиолипинсинтаз В и С активный центр обращен в периплазматическое пространство.

Кардиолипинсинтаза В участвуют в образовании фосфатидилманнитола и дифосфатидилманнитола при инактивации гена маннитолпермеазы А. При одновременной активности генов кардиолипинсинтаз С и В не синтезируются фосфатидилманнитол и дифосфотиллманнитол, а уровень КЛ снижен.

КЛ стабилизирует комплекс II дыхательной цепи вне зависимости от уровня аэрации при культивировании *E.coli*.

КЛ принимает участие в фолдинге мембранных полипептидов OmpF, LacY и PhoA, стабилизируя димер SecYEG, выполняющий функцию транслокона для формирования нативной конформации данных белков.

Показано, что КЛ участвует в поддержании pH цитоплазмы клетки *E.coli* и отсутствие данного фосфолипида приводит к повышению pH внутриклеточной среды, что является результатом снижения мембранного протонного градиента.

Практическая значимость. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых подходов к применению антибиотиков и других биологических агентов в условиях их пониженной способности транспортироваться и метаболизироваться внутри клеток прокариот и эукариот.

На основе результатов данного исследования могут быть созданы средства регуляции и повышения энергетического уровня клеток, в частности кардиомиоцитов.

Мутант ВКТ12 представляет интерес для изучения его биологических свойств, так как отсутствие неспецифического транспортера OmpF тримера, как антигена внешней мембраны *E.coli*, может повлечь за собой изменение иммуногенности и патогенности штамма.

Результаты и методы исследований могут быть использованы в учебном процессе в рамках дисциплин: «Биотехнология», «Молекулярная биология», «Биохимия мембран», «Микробиология» и «Биохимия микроорганизмов» ИФМиБ КФУ.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Эксперименты проводились в лабораториях кафедры биохимии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия. Часть экспериментов выполнялась в лаборатории биохимии липидов кафедры биохимии и молекулярной биологии Центра наук о здоровье Университета Техас-Хьюстон, США. Личное участие заключалось в разработке темы исследований, выборе объектов для изучения, полном проведении экспериментов, обработке полученных результатов, их анализ и интерпретация.

Положения, выносимые на защиту:

1. Активный центр мембранного белка кардиолипсинтазы А направлен в сторону цитоплазмы, а кардиолипсинтаз В и С – в периплазматическое пространство клеток *E.coli*.
2. Кардиолипин стабилизирует нативную структуру комплекса II дыхательной цепи и транслокона SecYEG *E.coli*, который способствует фолдингу мембранных белков: пермеазы лактозы LacY, щелочной фосфатазы PhoA и порина OmpF.
3. Кардиолипин участвует в гомеостазе цитоплазматического pH *E.coli*.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий», III научно-практическая интернет-конференция (Казань, КФУ, ноябрь 2012),
2. «Биология – наука XXI века», 17 международная пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, РАН, апрель 2013),
3. «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» IV Международная научная онлайн конференция, посвященная 150-летию основания кафедры биохимии в Казанском университете (Казань, КФУ, октябрь 2013)
4. «Липидология – наука XXI века», Международная научно-практическая онлайн конференция (Казань, КФУ, ноябрь 2013).

Публикации. По данной теме опубликовано 4 работы в сборниках международных и всероссийских конференций и 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Основное содержание работы изложено на 122 страницах машинописного текста, диссертация иллюстрирована 29 рисунками. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы,

материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 5 отечественных и 121 зарубежных публикаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Используемые микроорганизмы

Штаммы *Escherichia coli* (лаборатория биохимии и молекулярной биологии Центра наук о здоровье Университета Хьюстон-Техас, шт. Техас, г. Хьюстон):

- 1) W3110 pFAS::amp - мутантный штам дикого типа с плазмидой pFAS, содержащей ген сукцинатдегидрогеназы *sdh* (WT pFAS)
- 2) BKT10 Δ clsA::kan - мутантный штам с делецией гена *clsA*, продуктом которого является фермент кардиолипсинсинтаза A
- 3) BKT11 Δ clsA/ Δ clsB::kan - мутантный штам с делецией генов *clsA*, *clsB*
- 4) BKT12 Δ clsA/ Δ clsB/ Δ clsC::kan- мутантный штам с делецией генов *clsA*, *clsB*, и *clsC*
- 5) BKT13 Δ clsA/ Δ clsC::kan- мутантный штам с делецией генов *clsA*, и *clsC*
- 6) BKT14 Δ clsB::kan - мутантный штам с делецией гена *clsB*
- 7) BKT15 Δ clsC::kan- мутантный штам с делецией гена *clsC*
- 8) BKT16 Δ clsA/ Δ clsC::kan - мутантный штам с делецией генов *clsA* и *clsC*
- 9) BKT12 Δ clsA/ Δ clsB/ Δ clsC::kan/pFAS::amp - мутантный штам с делецией генов *clsA*, *clsB*, *clsC* и содержащий плазмиду с геном *sdh* (BKT12 pFAS)

В работе использовали мутантные штаммы BKT10-16 с делецией гена маннитол пермеазы A *mtlA* (далее Δ mtlA).

В качестве контроля использовали штамм с «диким типом» W3110 (WT).

Трансформация плазмидой pFAS и трансдукция фагом P1 были осуществлены по методике и рекомендациям Манниатис, «Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование». (1984) и <http://www.scs.illinois.edu>

1.2. Методы исследования

1.2.1. *Культивирование микроорганизмов* осуществляли в среде Лурия-Бертани (ЛБ) при 30°C или 37°C при 250 об/мин до log-фазы ($ОП_{600}=0,6$). Для исследования топографии кардиолипсинсинтаз штаммы BKT10-16 с Δ mtlA выращивали на обедненной по глюкозе ЛБ-среде, содержащей 600мМ маннитола (<http://ru.scribd.com/doc/23261720/Molecular-Cloning-A-Laboratory-Manual-On-The-Web-Maniatis>).

Для исследования стабильности мембранных белковых комплексов штаммы BKT12 и W3110 выращивали в бутылках при высокой аэрации - 700 мл жидкой среды ЛБ в 3 л колбах до середины log фазы $ОП_{600}=0,6$ (37°C, 250 об/мин), а штаммы BKT12 pFAS и W3110 pFAS выращивали при низкой аэрации - 1400 мл в 2.5 л колбах (37°C, 250 об/мин) до стационарной фазы $ОП_{600}=3$ (Бирюков, Кузьмина, 1984), так как сверхэкспрессия сукцинатдегидрогеназы *sdh* с помощью плазмиды pFAS проходит в нефизиологических «анаэробных» условиях.

Антибиотики добавлялись в среду в соответствии с плазмидным или фаговым геном устойчивости к антибиотику до конечной концентрации: ампициллина 100 мкг/мл (pFAS), канамицина (*cls*) 25 мкг/мл.

1.2.2. Радиоактивное мечение и экстракцию фосфолипидов *E.coli* проводили с добавлением радиоактивного изотопа фосфора ^{32}P в фосфорной кислоте до 10 мКи/мл в среду при культивировании в течение ночи при 37°C до середины лог-фазы ($\text{ОП}_{600}=0.6$), или до стационарной фазы ($\text{ОП}_{600}=3$) при 250 об/мин с последующей кислой хлороформной экстракцией фосфолипидов клеток *E.coli*.

1.2.3. Одномерную тонкослойную хроматографию фосфолипидов (ТСХ) проводили в смеси растворителей метанол-хлороформ-вода-аммоний (37,5:60:3:1) на силикагелевых пластинках для высокоэффективной тонкослойной хроматографии фирмы Whatman и детектировали радиоактивный фосфор ^{32}P в фосфолипидах с использованием сцинциллятора.

1.2.4. Двумерную тонкослойную хроматографию фосфолипидов осуществляли последовательным разделением фосфолипидов в нейтральном водном направлении в смеси хлороформ-метанол-вода (65:25:4) и в кислом ацетатном в смеси хлороформ-метанол-уксусная кислота (65:25:10). Использовали пластинки для ТСХ 10x10 см фирмы Merck.

1.2.5. Полный клеточный лизат *E.coli* получали путем лизирования клеток в буфере (20 mM Трис, pH 7.5, 1% тритон X-100, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, ингибиторы протеаз) и ультразвуковой деструкцией клеточных стенок с 15% интенсивности (B03- Ultrasonic Processor, Китай), отобранных на логарифмической фазе роста культуры *E.coli*. Гомогенат инкубировали в течение 30 минут при 0°C и центрифугировали в течение 10 минут при 14000 об/мин. Затем собирали водную фазу, содержащую белки.

1.2.6. Мембранный экстракт *E.coli* получали путем гомогенизации клеток с давлением 8000 psi и центрифугированием при 30000 g в течение 20 мин при 4°C для осаждения неразрушенных клеток. Мембраны осаждали при 200000 g в течение часа при 4°C. Для получения гомогената мембран осадок ресуспендировали с использованием гомогенизатора Beckman potter. Концентрацию белка определяли методом на бицинкхониевую кислоту (BCA protein assay kit, BioRad).

1.2.7. Выделение внутренних мембран *E.coli* проводили используя гомогенизатор при 8000 psi, осаждая неразрушенные клетки при 30000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант центрифугировали при 150000 g в течение 1 часа при 4°C. Для получения гомогената осадок мембран ресуспендировали с использованием гомогенизатора Beckman potter. Концентрацию белка определяли методом на бицинкхониевую кислоту (BCA protein assay kit, BioRad).

1.2.8. Солюбилизацию мембранных белковых комплексов и электрофорез в ПААГ в нативных условиях проводили с использованием детергентов додецилмальтозида, дигитонина и тритона X-100. В дальнейшем, после оптимизации условий использовали только 2% дигитонин. Мембраны ресуспендировали ультразвуковым воздействием в течение 5 секунд при 15 % интенсивности. Пробы инкубировали при 4°C и покачивании в течение 2 часов. Центрифугировали в течение 15 минут при 20000 g при 4°C. Супернатант (солюбилизованные мембраны) инкубировали при 37°C в 4x буфере для образцов (BioRad) на шейкере-инкубаторе в течение 15 минут. Электрофорез проводили в градиентном 3-12% геле (использовали катодный, рабочий анодный буфер и маркер молекулярного веса для голубого нативного электрофореза,

BioRad). Электрофорез осуществляли при постоянном напряжении 300 мВ. Белки окрашивали кумасси G-250 фирмы BioRad.

1.2.9. Денатурирующий электрофорез белков в ДСН-ПААГ проводили по стандартной методике с использованием коммерческого 12,5% геля. Система для денатурирующего электрофореза белков, включая готовый буфер и гели, использовались фирмы Bio-Rad, либо Invitrogen и Thermo Scientific. Электрофорез осуществляли при постоянном напряжении 150 мВ. Белки окрашивали кумасси G-250 фирмы BioRad.

1.2.10. Вестерн-блот белков проводили по стандартной методике с использованием как жидкостной, так и полусухой систем переноса белков на мембрану (Bogdanov et al., 2010). Использовали следующие антитела: моноклональные антитела к SdhABCD, предоставленные лабораторией Cecchini (США); коммерческие поликлональные антитела к SecY, SecE/G и SecA (BioRad); моноклональные антитела к мономерам и тримерам OmpF порина, предоставленные лабораторией Hiroshi Nikado (Япония); коммерческие моноклональные антитела к пермеазе лактозы LacY (BioRad). Для исследования стабильности комплекса II *E.coli* использовали сукцинатдегидрогеназу (Sdh) - коммерческий продукт гена *Sdh* сукцинатдегидрогеназы *E.coli* с молекулярной массой около 480 кДа, предоставленную лабораторией Garry Cecchini (США). Результаты вестерн-блота проявляли с помощью ECL набора (BioRad) с использованием Kodak Image Station BioRad software.

1.2.11. Определение активности щелочной фосфатазы проводили с использованием среды Лурия-Бертани, освобожденной от фосфатов, в которой культивировали клетки и через заданные промежутки времени отбирали аликвоты. Метаболизм клеток останавливали консервантом мертиолятом натрия (тимеросалем). Клетки пермеабелизовали толуолом и добавляли субстрат п-нитрофенилфосфат. После чего проводили количественную колориметрическую реакцию на свободную фосфатную группу. Ферментативную активность вычисляли по формуле: $\text{mU/мг белка} = \text{ОП}_{400} \times 24 \times 7,19 / \text{время инкубации в минуту} / \text{на количество белка в мг}$.

1.2.12. Измерение клеточного pH *E.coli* осуществляли с помощью адаптированной методики Puchkov et al., 1983. Осадок клеток ресуспендировали в буфере для измерения pH из расчета 0.5 мг клеток на мл буфера. Флуоресценцию регистрировали при 430 нм (Synergy™ HT, BioTek), последовательно добавляя в кювету к 9-Аминоакридин (9АА 10 μM конечная концентрация), интактные клетки, нигерицин (4 мкг/мг общего клеточного белка), KCl в конечной концентрации 100 mM для отмены действия нигерицина и оценки неспецифически связанного 9АА и FCCP - карбонил цианид-4-(трифлуорометокси) фенилгидразон (10-50 μM , растворен в ДМСО). Результаты выражали по формуле: $\Delta\text{pH} = (\log Q/1-Q) \times (V_v/V_o)$ где, Q - общая флуоресценция, V_v - внутренний объем клетки, V_o - общий объем раствора. Внутренний объем клетки *E.coli* = 6,34 мл/мг белка (Bogdanov and Dowhan, 1995).

1.2.13. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Исследования проводили в трех-пяти повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Топография кардиолипсинсинтаз ClsA, ClsB и ClsC внутренней мембраны *E.coli*

Штаммы *E.coli*, мутантные по гену маннитолпермеазы $\Delta mtlA$, которая расположена во внутренней мембране, не способны транспортировать маннитол внутрь клетки. Однако кардиолипсинсинтаза может присоединить к маннитолу фосфатидную группу от КЛ с образованием фосфатидилманнитола (ФМ), который может вступать в реакцию конденсации с фосфатидилглицерином с образованием дифосфатидилманнитола (ДФМ). Далее ФМ и ДФМ проникают в клетку с помощью пермеаз сахаров с низкой субстратной специфичностью (Shibuya and Hiraoka, 1992).

Таким образом, различное сочетание удаления генов кардиолипсинсинтаз при одновременной делеции гена маннитолпермеазы позволит определить топографию активных центров кардиолипсинсинтаз на внутренней мембране, благодаря наличию или отсутствию фосфатидилманнитола и дифосфатидилманнитола в клетке.

По результатам ТСХ с радиоактивной меткой ^{32}P в клетках положительного контроля - штамма дикого типа (WT), в котором активны все три кардиолипсинсинтазы, обнаружен ФМ и уровень КЛ соответствует нормальному содержанию в клетках *E.coli* (рисунок 1 А). В клетках мутантного по всем трем кардиолипсинсинтазам штамма ВКТ12 - отрицательный контроль, кардиолипина, ФМ и ДФМ не обнаружено (рисунок 1 Б).

Активность только кардиолипсинсинтазы А (ClsA) приводит к отсутствию в клетках ФМ и ДФМ и почти полному отсутствию кардиолипина (рисунок 1 Г), следовательно, КЛ - субстрат для образования ФМ и ДФМ в периплазматическом пространстве не был синтезирован.

Одновременная активность ClsA с ClsB или ClsA с ClsC приводит к образованию ФМ, уровень КЛ соответствует нормальному содержанию в клетках *E.coli* (рисунок 1 З и Ж). Следовательно, активность ClsB или ClsC приводит к появлению ФМ в клетках.

В штаммах с активной только ClsC был обнаружен КЛ, количество которого соответствует нормальному содержанию в клетках *E.coli*, и ФМ (рисунок 1 Д).

Активность только ClsB приводит к образованию в клетках как ФМ, так и ДФМ, что указывает на то, что ClsB отличается по специфичности от ClsA и ClsC. КЛ обнаружен в количестве, соответствующем нормальному содержанию (рисунок 1 В).

Одновременная активность ClsC и ClsB (рисунок 1 Е) не приводит к образованию ФМ и ДФМ, а уровень КЛ снижен.

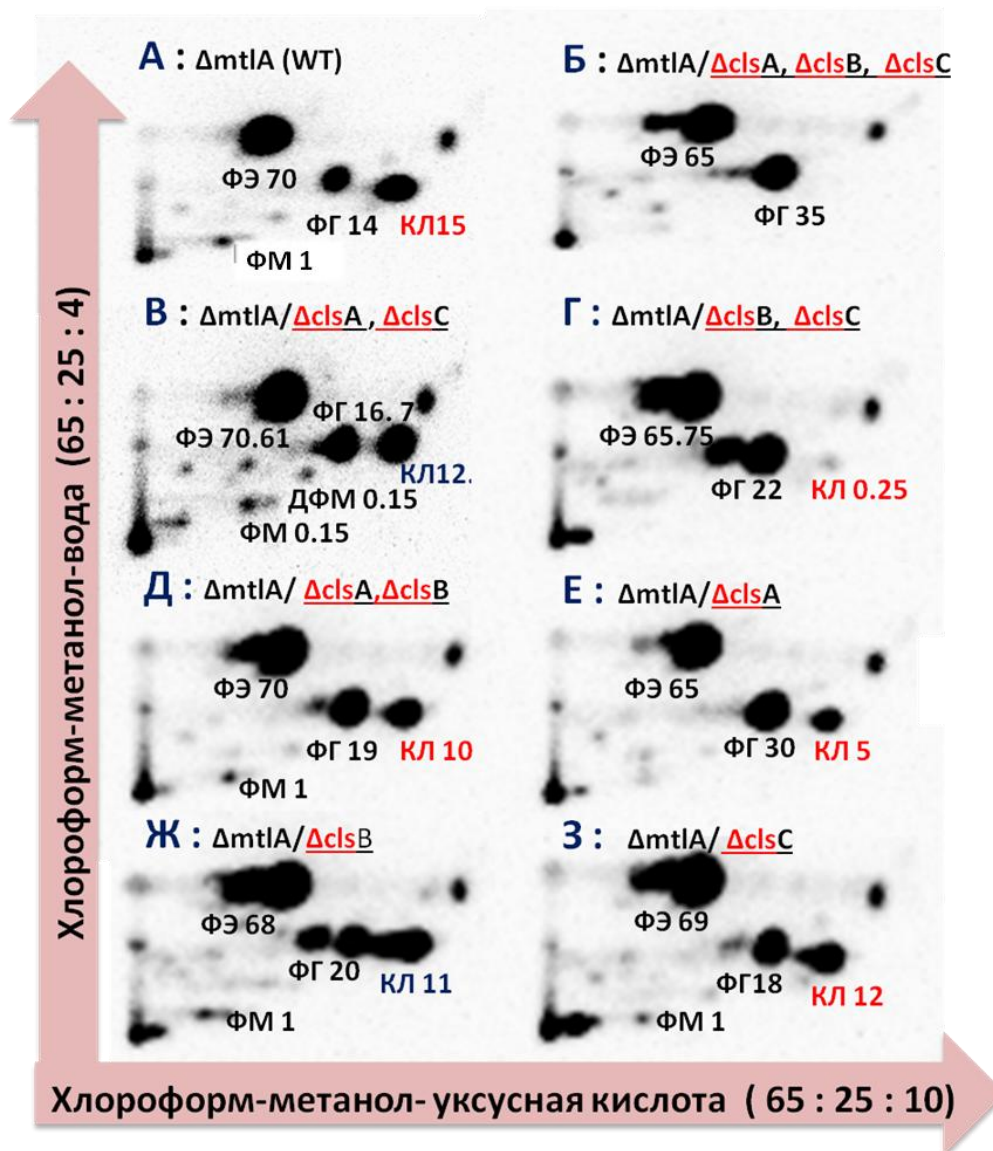


Рисунок 1. Фосфолипидный анализ штаммов *E.coli*, мутантных по генам маннитолпермеазы и кардиолипсинтаз. $\Delta mtlA$ – делеция в гене маннитолпермеазы А, $\Delta clsA$, $\Delta clsB$, $\Delta clsC$ – в генах кардиолипсинтаз А, В и С соответственно. ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФГ – фосфатидилглицерин, КЛ – кардиолипин, ФМ – фосфатидилманнитол, ДФМ – дифосфатидилманнитол. Доля фосфолипидов выражена в процентах. Первое разделение в вертикальном направлении, второе – в горизонтальном. WT – дикий тип *E.coli*

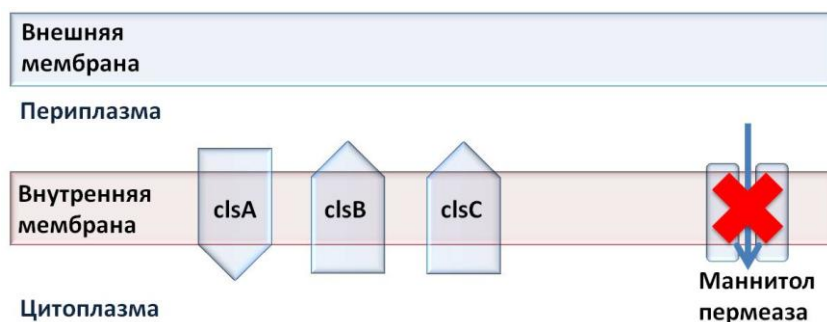


Рисунок 2. Модель расположения активных центров кардиолипсинтаз $clsA$, $clsB$ и $clsC$ на внутренней мембране *E.coli*. Красным крестом обозначено отсутствие работы маннитолпермеазы, транспортирующей маннитол внутрь клетки.

Некоторые авторы показали (Kim, 2008; Tan *et al.*, 2012), что регуляция и ингибирование экспрессии гена *clsC* зависит от продукта соседнего гена *clsB*, но только во время транскрипции с одного оперона, механизм стимулирования остается не выясненным, однако уникален и пока не обнаружен у других организмов, кроме *E.coli*. Таким образом, можно предположить, что при одновременной активности ClsC и ClsB происходит взаимная регуляция экспрессии генов этих кардиолипинсинтаз, и кардиолипинсинтаза В имеет большое значение при определенных условиях существования клетки и имеет очень сложную регуляцию, что требует дальнейших исследований.

Анализ полученных результатов ТСХ штаммов *E.coli*, мутантных по генам маннитолпермеазы и кардиолипинсинтазам, позволяет заключить, что активный центр кардиолипинсинтазы А ориентирован в цитоплазму, в то время как активные центры кардиолипинсинтаз В и С – в периплазматическое пространство (рисунок 2).

Различное расположение активного центра кардиолипинсинтаз, по всей видимости, обеспечивает синтез КЛ по разные стороны от мембраны *E.coli*.

2.2. Роль кардиолипина в ассоциации субъединиц комплекса II дыхательной цепи

Комплекс II, сукцинатдегидрогеназа (*sdh*), или сукцинат-коэнзим Q редуктаза (SQR) дыхательной цепи *E.coli* играет важную роль в процессе окислительного фосфорилирования, обеспечивая транспорт электронов на убихинон. Комплекс состоит из 4 субъединиц (Sdh A,B,C,D) и *in vivo* во внутренней мембране *E.coli* представляет собой тример тетрамера (SdhCDAB)₃ с молекулярной массой около 480 кДа, из которых А и В располагаются в водной среде (55-65 и 25-30 кДа), а С и D (12-15 кДа) внутри мембраны (Lancaster and Kroger, 2000).

Методом рентгеноструктурного анализа комплекса II *E.coli* внутренних мембран показано наличие КЛ в структуре данного комплекса, а именно в структуре его мембранной части SdhCD (Yankovskaya *et al.*, 2003). Также было показано влияние КЛ на образование суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий эукариот (Pfeiffer *et al.*, 2003).

Однако отсутствуют экспериментальные подтверждения роли КЛ в стабильности и активности комплекса II *E.coli in vivo* и не выяснено, будет ли отсутствие КЛ причиной реорганизации комплекса II, что может в дальнейшем привести к изменению мембранного протонного градиента.

Для данного исследования были использованы штаммы BKT12 и W3110 (далее WT) с плазмидой pFAS, содержащей ген сукцинатдегидрогеназы *sdh*.

Результаты ТСХ показали, что содержание фосфолипидов у WT pFAS, соответствует нормальному содержанию фосфолипидов в штаммах дикого типа W3110 (WT) *E.coli*, а у BKT12 pFAS - отсутствие КЛ (рисунок 3).

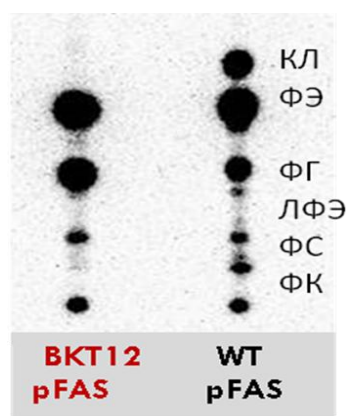


Рисунок 3. Хроматограмма фосфолипидов *E.coli*, меченых ^{32}P . BKT12 – тройной мутант по генам кардиолипинсинтаз, pFAS – плазмида, содержащая ген сукцинатдегидрогеназы, WT – штамм W3110 с фенотипом «дикого типа». КЛ – кардиолипин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ФГ – фосфатидилглицерин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФК – фосфатидная кислота.

В штамме BKT12 значимого отличия от WT в наличии субъединиц *sdh* и их молекулярной массе не обнаружено, что наблюдается как при электрофорезе белков внутренних мембран в денатурирующих условиях, так и при последующем вестерн-блоте белков (рисунок 4). Отсутствие различий свидетельствует о том, что КЛ не влияет на фолдинг и структуру отдельных субъединиц SdhABCD.

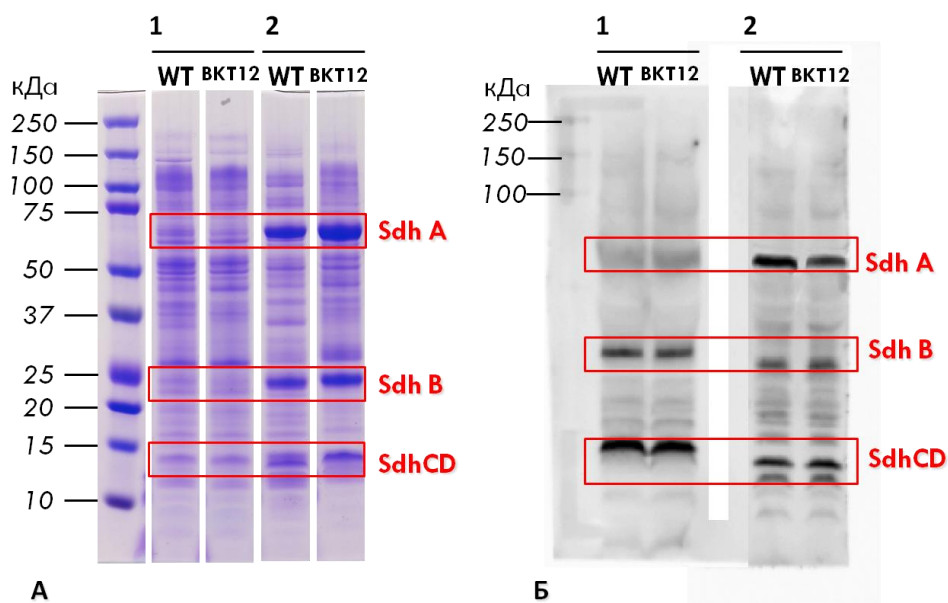


Рисунок 4. Электрофореграмма субъединиц сукцинатдегидрогеназы в ПААГ в денатурирующих условиях (А) и вестерн-блот субъединиц с пАТ к Sdh (Б). 1: WT – штамм с «диким типом», BKT12 – тройной мутант по генам кардиолипинсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*. 2 – WT и BKT12 с плазмидой pFAS.

Голубой нативный электрофорез (далее электрофорез в нативных условиях) позволяет оценить стабильность суперкомплекса II, не повредив его нативную структуру, что дополнительно предотвращается процедурой солюбилизации 2% дигитонином (Reisinger and Eichacker, 2006).

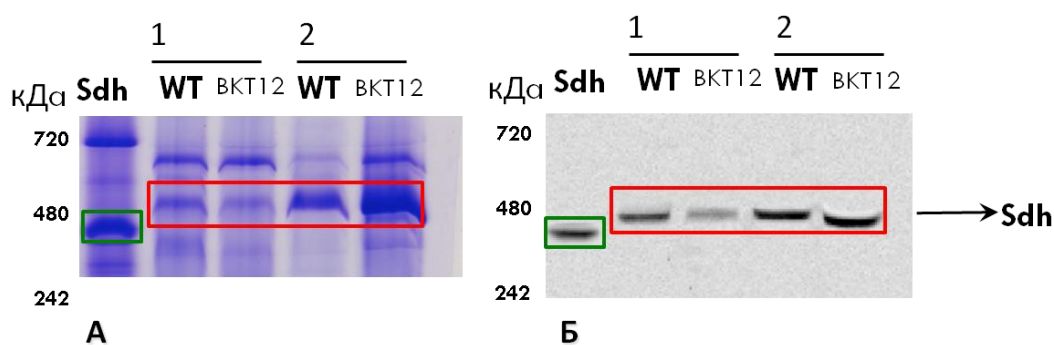


Рисунок 5. Электрофореграмма солюбилизованных внутренних мембран в ПААГ в нативных условиях (А) и вестерн-блот сукцинатдегидрогеназы (Б). 1. WT – штамм с «диким типом», BKT12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*. 2 – WT и BKT12 с плазмидой pFAS. Sdh - коммерческий белок сукцинатдегидрогеназы *E.coli* (контроль)

Методами электрофореза в нативных условиях и вестерн-блота солюбилизованных мембранных белков у мутанта BKT12 обнаружено отсутствие тримера тетрамеров (SdhCDAB)₃ комплекса II дыхательной цепи, что свидетельствует о нестабильности этого комплекса во внутренней мембране в отсутствии кардиолипина (рисунок 5: 1 А и 1 Б).

Но в условиях низкой аэрации при индукции плазмиды pFAS повышалась экспрессия белка *sdh* как у трансформантов WT pFAS, так и в BKT12 pFAS (рисунок 5: 2 А и 2 Б). Эти данные подтверждались жизнеспособностью BKT12 pFAS на среде с сукцинатом как единственным источником углерода, и отсутствием жизнеспособности у BKT12 без плазмиды (данные не представлены). Это может быть связано со сверхэкспрессией всех субъединиц комплекса II с плазмиды pFAS в экстремальных условиях при низкой аэрации.

Очевидно, что при физиологических условиях культивирования КЛ оказывает стабилизирующее действие на комплекс II дыхательной цепи и его отсутствие приводит к дестабилизации тетрамера. А в условиях экспрессии *sdh* с плазмиды отсутствие КЛ приводит к снижению молекулярной массы тетрамера (SdhCDAB)₃ у BKT12 pFAS, вероятно, в результате неполной ассоциации субъединиц комплекса (рисунок 5: 2 Б).

2.3. Роль кардиолипина в стабильности и активности транслокона SecYEG/SecA

Для встраивания белков в мембрану *E.coli* необходимы распознавание места расположения белка в мембране и его фолдинг в правильной функциональной конформации. Данный процесс опосредован SecYEG транслоказой и YidC инсертазой (Driessen and Nouwen, 2008).

Транслоконовый комплекс SecYEG содержит 7 белков: белок-шаперон SecB, АТФазу SecA, интегральный мембранный комплекс SecYEG, состоящий из белков SecY, SecE и SecG, а также два дополнительных белка SecD и SecF, способствующих высвобождению транспортируемого белка в периплазматическое пространство. Комплекс SecYEG с молекулярной массой 130 кДа присутствует в

нативной форме в виде димера (SecYEG)₂ и образует канал, необходимый для транспорта и встраивания белка в мембрану.

Белок SecA является моторным белком, инициирующим реакцию транслокации с гидролизом молекулы АТФ. Молекулярная масса суперкомплекса варьирует в пределах 240-270 кДа в зависимости от наличия аффинного взаимодействия с SecA и используемого детергента при его солюбилизации (Veenendaal *et al.*, 2004; Driessen and Nouwen, 2008; Maier *et al.*, 2008; Duong, 2003).

Методом рентгеноструктурного анализа суперкомплекса SecYEG *E.coli* было обнаружено присутствие КЛ в структуре мембранного белкового транслоконного комплекса (SecYEG)₂. Вероятно КЛ принимает участие в поддержании функциональной конформации и стабильности SecYEG димера, необходимых для формирования высокоаффинного белок-белкового взаимодействия с АТФазой SecA, а также для стимулирования АТФазной активности этого белка (Gold *et al.*, 2010). Но экспериментальных доказательств роли КЛ в структурной организации и функции SecYEG транслокона *in vivo* до настоящего времени не проводилось.

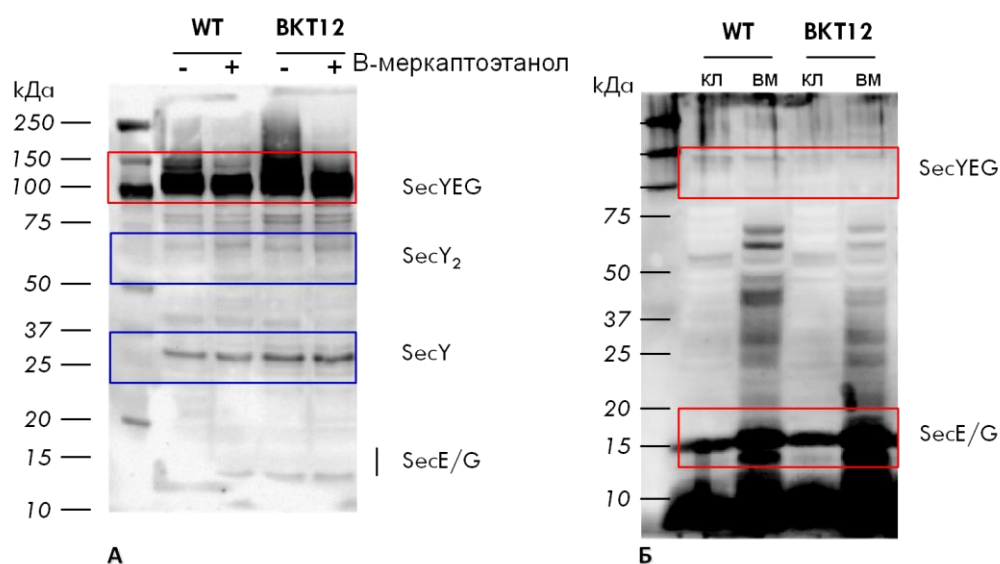


Рисунок 6. А - Результаты вестерн-блота с пАТ к secY после ДСН-ПААГ. Б - Результаты Вестерн-блота пАТ к secG после ДСН-ПААГ. КЛ - клеточный лизат. ВМ - внутренние мембраны. WT – штамм с «диким типом», BKT12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*.

В результате вестерн-блота SecYEG с поликлональными антителами (пАТ) к SecY и SecG показано наличие в клетках как дикого типа WT, так и мутанта BKT12 отдельных субъединиц транслокона SecYEG (рисунок 6).

Большая часть SecY агрегировала в мономер SecYEG, так как отсутствует SecY₂. Так как добавление β-меркаптоэтанола не повлияло на диссоциацию мономера SecYEG (рисунок 6 А), следовательно комплекс SecYEG стабилизирован не дисульфидными связями между субъединицами.

Так как все субъединицы расположены во внутренней мембране *E.coli* и отсутствуют в клеточном лизате (рисунок 6 Б), что свидетельствует об их стабильном связывании с внутренней мембраной, следовательно отсутствие кардиолипина не повлияло на встраивание отдельных белковых субъединиц комплекса SecYEG в мембрану. Отсутствие окрашивания антителами к SecG

мономера SecYEG может быть связано с конформацией макромолекулярного комплекса и недоступностью этой субъединицы для антител.

При исследовании формирования суперкомплекса (SecYEG)₂ и его стабильности *in vivo* было обнаружено, что в отсутствие КЛ молекулярная масса димера SecYEG меньше, чем в диком типе WT, следовательно, КЛ принимает участие в образовании димерной формы SecYEG и стабилизирует макромолекулярный комплекс (рисунок 7 А).

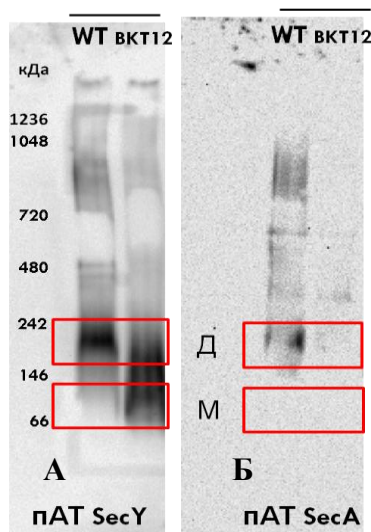


Рисунок 7. Результаты вестерн-блота с пАТ к SecY (А) и SecA (Б) после голубого нативного электрофореза. WT – штамм с «диким типом», BKT12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*. Д - димер SecYEG. М - мономер SecYEG

Во внутренней мембране BKT12 отсутствовала АТФаза SecA (рисунок 7 Б), что свидетельствует о нарушении функциональной конформации димера SecYEG, необходимой для аффинного связывания с SecA, а, следовательно, нарушении работы всего макромолекулярного комплекса транслокона SecYEG, одна из важнейших функций которого - транспорт и фолдинг белков в наружной мембране *E.coli*, таких как, например, порин OmpF и OmpA (Varma and Jakobsson, 2004; Baars, 2007) и в периплазматическом пространстве, таких как щелочная фосфатаза и пермеаза лактозы (White, 2003; Dowhan, 2009; Gold, 2010).

2.4 Роль кардиолипина в сборке порина OmpF *E.coli*

В полученных исследованиях показано *in vivo*, что КЛ принимает участие в формировании димера SecYEG (п. 2.3), который необходим для дальнейшего транспорта и фолдинга пробелков, в том числе и мономеров поринов к наружной мембране *E. coli*, для дальнейшего их формирования в тримеры, являющиеся нативной структурой порина OmpF (Varma and Jakobsson, 2004; Baars, 2007).

Трансмембранный порин OmpF грамотрицательных бактерий выполняет функцию неспецифического транспортера низкомолекулярных полярных молекул (вода, ионы, глюкоза) и локализован в наружной мембране *E.coli* в виде тримера с молекулярной массой ~100 кДа, тогда как индивидуальный мономер имеет M_r ~39 кДа (Baars, 2007).

В исследовании было проверено наличие тримеров и мономеров порина OmpF в мембранном экстракте мутантов ВКТ12 с отсутствием КЛ относительно дикого типа W3110 (WT).

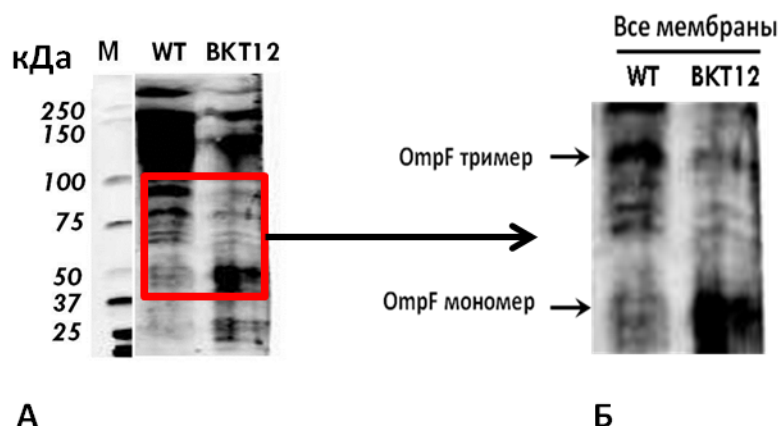


Рисунок 8. Результаты вестерн-блота с моноклональными антителами (мАТ) к порину OmpF. А. Изображение результатов вестерн-блота с маркером, Б. Мономеры и тримеры порина OmpF. WT – штамм с «диким типом», ВКТ12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*.

На рисунке 8 представлен типичный вестерн-блот мембранных белков после электрофореза в денатурирующих условиях с моноклональными антителами к OmpF мономерам. В мембранах клеток дикого типа (WT) присутствует большое количество тримеров и их спонтанных агрегатов, а в мутанте ВКТ12 обнаружены только OmpF мономеры (рисунок 8 А), что может быть связано с нарушением фолдинга тримеров OmpF транслоконом SecYEG в отсутствии КЛ (рисунок 8 Б).

Мутант ВКТ12 представляет интерес и для изучения его биологических свойств, так как возможное отсутствие OmpF тримера во внешней мембране может повлечь за собой изменение иммуногенности и патогенности штамма.

2.5. Роль кардиолипина в функционировании щелочной фосфатазы PhoA *E.coli*

SecYEG переносит новосинтезируемые полипептидные цепи щелочной фосфатазы в периплазматическое пространство *E.coli*. Щелочная фосфатаза бактерий устойчива к инактивации, денатурации, деградации и ее секреция в периплазматическое пространство зависит от фосфолипидного состава мембран (Бадякина и др.,2003; Головастов и др.,2003). Функцией фосфатазы является дефосфорилирование органических молекул, так как многие фосфорилированные соединения не могут проникать через плазматическую мембрану.

Нативная конформация фермента - это димер (140–160 кДа), имеющий оптимум рН 8.0 (Coleman, 1992).

Таким образом для активности щелочной фосфатазы необходимо соблюдение Δ рН гомеостаза клетки, которое зависит от целостности и проницаемости ее мембран.

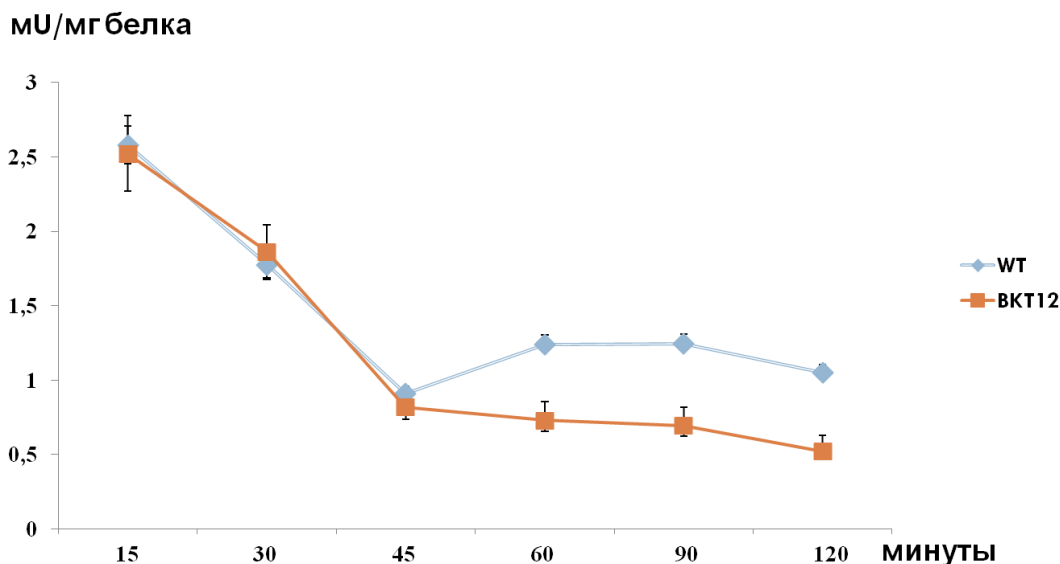


Рисунок 10. Ферментативная активность щелочной фосфатазы. WT – штамм с «диким типом», BKT12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*.

Впервые обнаружено, что у дикого типа WT *E.coli* достоверно проявляется активность щелочной фосфатазы, начиная с 45 минуты инкубации (начало реакции), а у мутанта BKT12 - активность уменьшается, следовательно, функциональность фермента нарушена.

Ранее было выявлено (Головастов и др., 2003; Золов и др., 2002), что фосфатидилглицерин и фосфатидилэтаноламин необходим для секреции щелочной фосфатазы и показано взаимодействие пробелков PhoA *in vitro* с анионными фосфолипидами в клетке *E.coli*.

Полученные в ходе исследования данные указывают на то, что КЛ не только стабилизирует транслоконовый суперкомплекс SecYEG, влияя на фолдинг пробелков PhoA, но и как анионный фосфолипид может непосредственно участвовать в процессе секреции щелочной фосфатазы *E.coli*.

2.6. Влияние кардиолипина на транслокацию и сборку пермеазы лактозы LacY

В исследованиях Dowhan с коллегами (Dowhan and Bogdanov, 2009) было показано, что у штаммов *E.coli* с делецией гена белка SecY транслокона SecYEG наблюдается отсутствие сборки петель LacY в нативную структуру (33-45 кДа), по сравнению с диким типом, что подтверждает предположение о том, что транслокон SecYEG может участвовать в фолдинге LacY во внутренней мембране *E. coli*.

В проведенных исследованиях было показано, что КЛ влияет на нативность конформации суперкомплекса (SecYEG)₂, следовательно, у мутанта BKT12 с делециями всех кардиолипсинтаз может происходить нарушение транслокации и встраивания во внутреннюю мембрану важного транспортера *E.coli* пермеазы лактозы LacY.

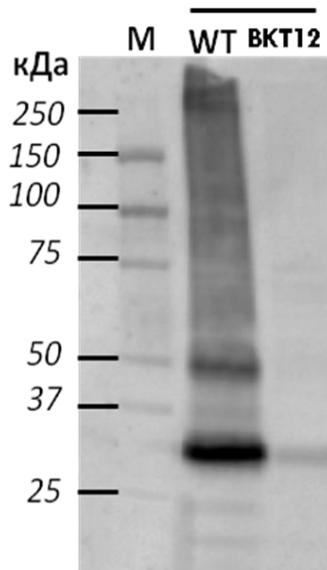


Рисунок 11. Результаты вестерн-блота с мАТ к LacY после ДСН-ПААГ-электрофореза. WT – штамм с «диким типом», BKT12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*.

У мутанта BKT12 наблюдается почти полное отсутствие белка LacY во внутренней мембране по сравнению с диким типом, следовательно, нарушена белковая структура LacY, необходимая для распознавания антителами, и/или происходит его неполное встраивание, т.е. "протягивание" через транслокон SecYEG по причине нарушения его стабильности и функциональности в отсутствии КЛ (рисунок 11).

Результаты данного исследования *in vivo* подтвердили предположение о том, что кардиолипин влияет на сборку и встраивание LacY во внутренней мембране *E.coli*.

По последним данным (Zhu and Kaback, 2013) гидрофобное окружение из фосфолипидов необходимо для связывания LacY с шапероном YidC, который связывается с функционально-активным димером SecYEG, принимающим участие в транслокации полипептидов LacY, следовательно, КЛ необходим не только в формировании нативной конформации (SecYEG)₂, но и важен для белок-белковых взаимодействий и дальнейшего фолдинга LacY.

2.7. Роль кардиолипина в поддержании цитоплазматического pH *E.coli*

В результате предварительных экспериментов было обнаружено, что по сравнению с диким типом WT мутантные штаммы *E.coli* с отсутствием гена *clsA* нежизнеспособны на среде ЛБ с pH 8.5, а у штаммов с делецией гена *clsC* снижена жизнеспособность, но штамм, где была активна только ClsB рос нормально, что может подтвердить предположение о том, что когда экспрессируется только одна *clsB*, ее активность отлична от действия других кардиолипинсинтаз (данные не представлены).

Исходя из полученных наблюдений было предположено, что КЛ может быть ответственен за поддержание баланса мембранного и межмембранного pH *E.coli*, необходимого для работы важнейших белковых комплексов и транспортеров.

Возможно, что диссоциация комплекса II дыхательной цепи у мутантов ВКТ12 является важным фактором нарушения протонного градиента мембран *E.coli*.

Для проверки данных предположений с помощью последовательного добавления флуорофоров был измерен периплазматический и цитоплазматический рН интактных клеток дикого типа WT и мутанта ВКТ12 *E.coli*. При понижении рН флуоресценция 9АА увеличивается, поэтому 9АА флуоресцирует сильнее при низких значениях рН (контроль, данные не представлены). Показательными являются результаты при физиологических значениях рН 7 (рисунок 12).

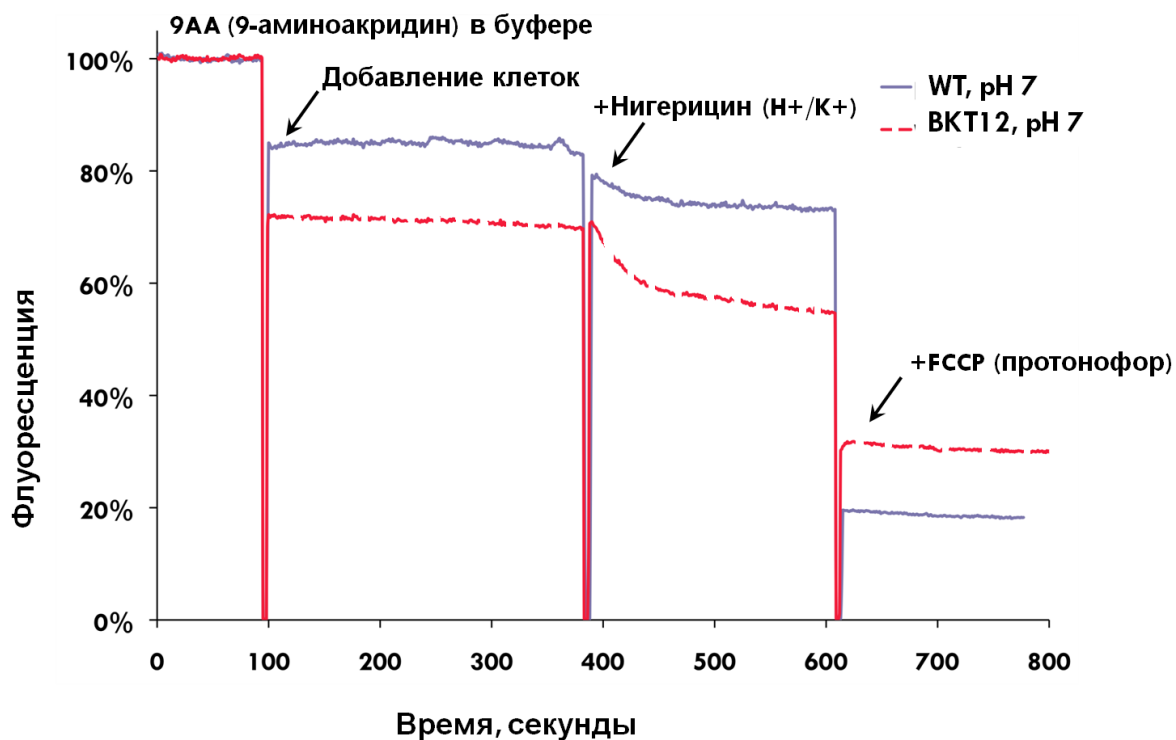


Рисунок 12. Типичные результаты измерения флуоресценции 9АА при рН 7 (возбуждение- 400 нм, флуоресценция-430 нм). WT – штамм с «диким типом», ВКТ12 –тройной мутант по генам кардиолипсинтаз *clsA*, *clsB* и *clsC*.

Уменьшение флуоресценции сильного основания 9АА после добавления интактных клеток ВКТ12 по сравнению с WT свидетельствует о меньшем количестве протонов в периплазматическом пространстве ВКТ12.

После добавления антибиотика нигерицина, который активирует антипортеры обмена протона в клетку на калий из клеток, флуоресценция 9АА в образце с ВКТ12 уменьшается, что свидетельствует об уменьшении количества протонов в периплазматическом пространстве. Следовательно, у мутантов по сравнению с диким типом, может быть нарушено сопряжение протонов водорода с мембранами.

Протонофор карбонил цианид-4-(трифлуорометокси) фенилгидразон (FCCP) инициирует транспорт протонов через клеточную мембрану, что приводит к уменьшению флуоресценции 9АА вследствие снижения концентрации протонов в периплазме. Но флуоресценция 9АА в образцах с клетками ВКТ12 выше по отношению к флуоресценции с клетками дикого типа, следовательно ΔpH ВКТ12 ($\Delta pH = 0.2$) меньше, чем у дикого типа ($\Delta pH = 0.9$).

Исходя из полученных данных можно заключить, что КЛ участвует в поддержании электрохимического градиента протонов опосредованно, стабилизируя структуру и функциональную активность комплекса II дыхательной цепи, а также, непосредственно, как анионный фосфолипид, акцептируя протоны на мембранах *E.coli*.

Выводы

1. Активный центр кардиолипинсинтазы А в плазматической мембране *E.coli* направлен в цитоплазму, а кардиолипинсинтаз В и С – в периплазму.
2. Кардиолипин необходим для ассоциации белковых субъединиц в макромолекулярный комплекс II дыхательной цепи *E.coli* и поддержания его стабильности.
3. Кардиолипин стабилизирует SecYEG димер, необходимый для формирования функционально-активной конформации макромолекулярного комплекса транслокона.
4. Кардиолипин в структуре транслокона SecYEG необходим для фолдинга полипептидов мембранных белков *E.coli*: пермеазы лактозы LacY, щелочной фосфатазы PhoA и порина OmpF.
5. Кардиолипин участвует в поддержании протонного градиента и pH гомеостаза *E.coli*.

Основные публикации по теме диссертации:

1. Иванова В.В. Роль кардиолипина в сборке порина OmpF *E.coli* / В.В. Иванова, Т.А. Невзорова, М.В. Богданов // Фундаментальные исследования. Серия «Биологические науки». – 2013. – №8. – С.90-93 (список ВАК, авт. – 0.12 п.л.) .
2. Иванова В.В. Топография кардиолипинсинтаз в плазматической мембране *E. Coli* / В.В. Иванова, Т.А. Невзорова // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2013. – Т.155, кн.2. – С.120-127 (список ВАК, авт. – 0.25 п.л.) .
3. Рябичко С.С. Роль фосфолипидов в транслокации мембранных белков *E.coli* / С.С. Рябичко, В.В. Иванова, Ф.К. Алимова. // Фундаментальные исследования. Серия «Биологические науки». – 2013. – №10.- С. 207-215 (список ВАК, авт. – 0.2 п.л.).

Другие публикации по теме диссертации:

1. Иванова В.В. Кардиолипин стабилизирует комплексы белков в мембране *E.Coli* / В.В. Иванова, Т.А. Невзорова, М.В. Богданов // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых – 2013. – С.272-273.
2. Иванова В.В. Топография кардиолипинсинтаз в плазматической мембране *E. coli* / В.В. Иванова, Т.А. Невзорова, М.В. Богданов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии. III международная интернет - конференция. – 2012. – С.135-136.
3. Иванова В.В. Роль кардиолипина в сборке порина OmpF *E.coli* / Иванова В.В., Рябичко С.С., Невзорова Т.А., Богданов М.В., Алимова Ф.К. // Липидология – наука XXI века, Международная научно-практическая онлайн конференция. – 2013.
4. Рябичко С.С. Влияние распределения зарядов на внутренней мембране *E.coli* на конформацию интегральных белков // Рябичко С.С., Иванова В.В., Алимова Ф.К., Богданов М.В.. // Липидология – наука XXI века, Международная научно-практическая онлайн конференция. – 2013.
5. Рябичко С.С. Лизофосфатидная кислота влияет на транспорт мембранных белков *E.coli* / Рябичко С.С., Иванова В.В., Алимова Ф.К., Богданов М.В.// Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий» IV Международная научная онлайн конференция, посвященная 150-летию основания кафедры биохимии в Казанском университете. – 2013.

Искренняя благодарность выражается **лаборатории биохимии и молекулярной биологии Центра наук о здоровье Университета Хьюстон-Техас** в лице заведующего лабораторией **др. Вильяма Доуэна** за помощь и советы в процессе выполнения работы.

Благодарность выражается; аспирантам и студентам лаборатории культуры клеток животных и человека и лаборатории сельскохозяйственной биохимии и биотехнологии кафедры биохимии.

Адрес для отзывов на автореферат: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне.

Факс 8(843)238-76-01

E-mail: jassyra@mail.ru

Тел: Россия:+79673655209